

materia

Microbioloxía II

unidade didáctica **11**

O laboratorio de microbioloxía clínica: patoxénese e control

Ángeles Muñoz Crego, Ysabel Santos Rodríguez,
Carlos Ferreirós Domínguez e M^a Teresa Criado Álvarez

Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía
Facultade de Farmacia



VICERREITORÍA DE ESTUDANTES,
CULTURA E FORMACIÓN CONTINUA



unidade didáctica 11

O laboratorio de microbioloxía clínica: patoxénese e control

Ángeles Muñoz Crego, Ysabel Santos Rodríguez,
Carlos Ferreirós Domínguez e M^a Teresa Criado Álvarez
Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía
Facultade de Farmacia



Copyright © Universidade de Santiago de Compostela, 2012

Deseño

Unidixital

Edita

Vicerreitoría de Estudantes,
Cultura e Formación Continua
da Universidade de Santiago de Compostela
Servizo de Publicacións
da Universidade de Santiago de Compostela

Imprime

Unidixital

Servizo de Edición Dixital da
Universidade de Santiago de Compostela

Dep. Legal: C 1108-2012

ISBN 978-84-9887-905-6

ADVERTENCIA LEGAL: reservados todos os dereitos.
Queda prohibida a duplicación, total ou parcial desta
obra, en calquera forma ou por calquera medio (elec-
trónico, mecánico, gravación, fotocopia ou outros) sen
consentimento expreso por escrito dos editores.

MATERIA: Microbioloxía II

TITULACION: Grao en Farmacia

PROGRAMA XERAL DO CURSO

Localización da presente Unidade Didáctica:

Unidade Didáctica 1. Mecanismos microbianos de patoxenicidade e virulencia

Unidade Didáctica 2. Enfermidades infecciosas da pel, tecidos brandos e ollos

Unidade Didáctica 3. Enfermidades infecciosas do sistema respiratorio

Unidade Didáctica 4. Enfermidades infecciosas do sistema gastrointestinal

Unidade Didáctica 5. Enfermidades infecciosas do sistema xenitourinario

Unidade Didáctica 6. Enfermidades infecciosas do sistema cardiovascular

Unidade Didáctica 7. Enfermidades infecciosas do sistema nervioso

Unidade Didáctica 8. Zoonoses

Unidade Didáctica 9. Infeccións nosocomiais

Unidade Didáctica 10. Enfermidades infecciosas emerxentes e reemerxentes

Unidade Didáctica 11. O Laboratorio de Microbioloxía Clínica: patoxénese e control.

INDICE

| | |
|---|----|
| Presentación | 7 |
| Xustificación | 7 |
| Obxectivos | 8 |
| Metodoloxía docente | 9 |
| Contidos | 10 |
| 1. O Laboratorio de Microbioloxía Clínica: normas de seguridade e hixiene | 10 |
| 2. A microbiota normal de pel e garganta: observación e cultivo..... | 11 |
| 2.1. Tinguadura simple e diferencial de Gram..... | 15 |
| 2.2. Illamento e obtención de cultivos puros | 18 |
| 3. Mecanismos de patoxenicidade bacteriana | 21 |
| 3.1. Estudo da adherencia mediante aglutinación | 22 |
| 3.2. Estudo do crecemento en limitación de ferro | 25 |
| 4. Vías e modos de transmisión de patóxenos: o contacto directo..... | 27 |
| 5. Valoración da desinfección de alimentos cruz como método preventivo da transmisión de enfermidades gastrointestinais | 30 |
| 6. Recollida selectiva de refugалlos, esterilización e reciclaxe do material.. | 32 |
| 6.1. Métodos físicos..... | 34 |
| 6.2. Desinfección química | 35 |
| 6.3. Incineración | 36 |
| Avaliación da Unidade Didáctica | 38 |
| Recomendacións para o estudo da materia | 39 |
| Bibliografía básica e complementaria | 39 |

PRESENTACIÓN

Actualmente, a materia **Microbioloxía II** (4,5 créditos ECTS) impártese no segundo cuatrimestre do segundo curso do Grao en Farmacia da Universidade de Santiago de Compostela. Está, polo tanto, dirixida ao alumnado de 2º Curso que xa posúe coñecementos previos acadados na Microbioloxía I, que é impartida no primeiro cuatrimestre, e que trata dos aspectos básicos morfolóxicos, fisiolóxicos e xenéticos dos microorganismos.

Todos os estudantes de ciencias da saúde deben comprender os fundamentos da enfermidade infecciosa. As infeccións non se poden comprender sen certos coñecementos de Microbioloxía, e a infección é un dos principais mecanismos de produción de enfermidades, que pode afectar a calquera tecido ou órgano do corpo humano. No Grao de Farmacia, este obxectivo trátase de acadar na Microbioloxía II, cuxo programa está claramente dividido en once Unidades Didácticas nas que o profesorado tentará aproximar ao alumno, mediante un enfoque teórico e práctico, as causas e manifestacións das principais enfermidades de orixe infecciosa, as vías de transmisión de patóxenos así como os métodos de prevención e control de enfermidades. Deste modo preténdese simultanear a adquisición de coñecementos teóricos e a adquisición de destrezas na manipulación de microorganismos, así como o traballo en condicións asépticas.

A Unidade Didáctica 11 ten como finalidade reforzar e poñer en práctica os coñecementos adquiridos nas unidades precedentes. Pareceunos de especial interese para o alumno dispor dun manual práctico de laboratorio que recolla os obxectivos, fundamentos e procedementos de cada unha das clases prácticas que os alumnos van facer. Na presente Unidade Didáctica, concibida como dito manual, os alumnos poderán anotar as súas observacións e resultados. Deste xeito, o alumnado de Microbioloxía II desenvolverá unha maior e mellor conciencia microbiolóxica, que difire de calquera outro tipo de traballo experimental nun laboratorio, e que é o que lle imprime un carácter diferencial a esta disciplina. Este modo especial de actuar no laboratorio permitirá asentar e consolidar os conceptos fundamentais sobre esterilidade e contaminación.

XUSTIFICACIÓN

Entre as competencias xerais que deben alcanzar os futuros farmacéuticos (<http://www.usc.es/gl/centros/farmacia/titulacions.html?plan=14114&estudio=14115&codEstudio=13670&valor=9>) inclúese que sexan capaces de intervir nas actividades de promoción da saúde, prevención da enfermidade, no ámbito individual, familiar e comunitario, cunha visión integral e multiprofesional do proceso saúde-enfermidade.

Como competencia específica (B08), os alumnos deberán coñecer a natureza e comportamento dos axentes infecciosos. E entre as competencias transversais cítase a capacidade de aplicar os coñecementos na práctica (CS01).

Calquera destas competencias non serían posibles de alcanzar sen a práctica de laboratorio, traballo para o que se fai imprescindible comezar cunhas claras normas de seguridade e hixiene en calquera laboratorio de Microbioloxía Clínica. Nesta unidade recóllense experiencias, aínda que sinxelas, moi didácticas e demostrativas dalgúns dos mecanismos de patoxenicidade e mecanismos de transmisión de bacterias e métodos de prevención das infeccións asociadas. Ademais préstase especial interese aos sistemas de desinfección e esterilización que eviten unha posible fuxida dos patóxenos á comunidade e/ou medio ambiente, e á reciclaxe do material.

OBXECTIVOS

Seguen consta nos obxectivos do Grao en Farmacia da USC, a materia **Microbioloxía II** pretende dar unha visión dos microorganismos como axentes causais de enfermidades e dos principais mecanismos de transmisión e prevención. Entre os obxectivos xerais encóntranse:

- Entender os mecanismos xerais da patoxenicidade microbiana.
- Coñecer os métodos principais de control do crecemento microbiano.
- Recoñecer as principais manifestación clínicas das mais importantes enfermidades microbianas.

Estes obxectivos globais complementáanse cos obxectivos específicos desta Unidade Didáctica:

- Facer unha ensinanza baseada na observación experimental, que permita asentar os conceptos básicos necesarios para saber interpretar e solucionar os problemas que poidan xurdir na práctica microbiolóxica diaria.
- Facer experiencias sinxelas e creativas, pero rigorosas, que permitan ao alumnado recordar facilmente o seu fundamento teórico.

METODOLOXÍA DOCENTE

1. Clases Expositivas: os contidos da presente materia desenvolveranse con apoio audiovisual (diapositivas e recursos informáticos). Estas clases seguirán fielmente os contidos recollidos na Guía Docente da materia, a dispor do alumnado na Aula Virtual, na que tamén haberá diverso material complementario de consulta. No desenvolvemento da clase expositiva tentarase que o alumno reflexione sobre as ideas principais. En primeiro lugar, indicárase un esquema dos distintos contidos que se van presentar, expoñeranse os obxectivos perseguidos na UD, para pasar a continuación a desenvolver de xeito ordenado os diferentes contidos e concluír cunha síntese final.

2. Laboratorio práctico: Durante as prácticas tentarase que o alumno desenvolva as destrezas necesarias para a manipulación de microorganismos, de material estéril e das técnicas de traballo en condicións asépticas. As clases prácticas preséntanse como un único bloque no que se pretende poñer de relevo as relacións entre os microorganismos e o ser humano así como a capacidade patóxénica e os modos e vías de transmisión de microorganismos patóxenos, os cales constitúen os elos da cadea infecciosa.

O traballo persoal do alumno nesta actividade require unha boa actitude individual. Esta Unidade Didáctica nace para que o alumno dispoña dun manual de laboratorio, que incluírá consideracións xerais sobre o traballo, así como un guión de cada unha das prácticas que se van realizar, que constará dunha breve presentación dos fundamentos e da metodoloxía a seguir. O alumno deberá acudir a cada sesión de prácticas despois de ler atentamente o contido do manual. Tras a explicación do profesor, o alumno realizará individualmente, ou en grupos reducidos, as experiencias e observacións necesarias para a consecución dos obxectivos da práctica, para o que contará coa supervisión do profesorado.

3. Clases Interactivas: Clases dirixidas polo profesor/a empregando como base diversos medios audiovisuais (noticias prensa, vídeos, ...), que servirán para ilustrar os temas que se van debater. O alumno debe participar activamente e a asistencia considérase obrigatoria.

CONTIDOS

1. O laboratorio de Microbioloxía Clínica: normas de hixiene e seguridade

En todo momento, débense ter en conta as normas xerais establecidas pola USC, que deben ser xa coñecidas polos alumnos. Poden consultarse no seguinte enderezo:

http://www.usc.es/export/sites/default/gl/centros/farmacia/descargas/horarios1112/Normas_de_seguridade_nos_laboratorios_de_practicas.pdf

As normas de seguridade e hixiene específicas do Laboratorio de Microbioloxía Clínica son:

- É imprescindible o uso da bata de laboratorio.
- Cada estudante ten un lugar de traballo no laboratorio. Como tal, ten que mantelo limpo e ordenado seguindo o principio "cada cousa no seu sitio e un sitio para cada cousa". As roupas e efectos persoais teñen que gardarse fóra do laboratorio.
- Todo traballo microbiolóxico debe estar presidido por: orde, limpeza e habilidade para aumentar a eficacia do mesmo. Ao remate de cada práctica, o material de refugallo depositarase nas bandexas ou cestiños adecuados para ser levado a esterilizar antes do seu lavado.
- No manual anotaranse as explicacións e o traballo feito, pero libros, carpetas ou outro material deben estar apartados do lugar de traballo. As notas tomaranse ao remate da práctica e ca mesa perfectamente recollida.
- Mentres se traballa, hai que evitar calquera outra actividade (beber, comer...) e non esquecer que se están a manipular microorganismos patóxenos ou potencialmente patóxenos.
- Non tocar en ningún caso os cultivos nin abrir o material estéril. Hai que tomar conciencia de que é sempre imprescindible traballar na contorna da chama. Non esquecer que se está traballando con material estéril e hai que evitar sempre as contaminacións. En todo caso, débese ter moita precaución cos chisqueiros asegurándose que todas as chaves de paso estean pechadas ao remate da práctica, evitando a presenza de sustancias inflamables (alcol) nas proximidades da chama.
- Deben evitarse os desprazamentos innecesarios polo laboratorio, xa que poden crear correntes que orixinen contaminacións ou producir accidentes. Tampouco abríranse as ventás.

- Cada estudante é responsable do material do seu lugar de traballo e ten de quedar perfectamente limpo e ordenado ao rematar cada práctica (retirar o papel de filtro, etc..). No caso de accidente (derrame dalgún cultivo bacteriano), débese avisar inmediatamente ao profesor/a para tomar as medidas adecuadas. En cada mesa haberá un frasco de cloruro mercúrico 1/1000 ou outro desinfectante, como alcol.
- Nunca se debe tirar nada polo sumidoiro ou o lixo común, nin baixo ningún concepto se pode sacar ningunha mostra do laboratorio.
- Antes de saír do laboratorio, deben lavarse e desinfectarse as mans.
- Todo o traballo realizado seguindo as normas que se indican teñen como finalidade formar unha "conciencia bacteriolóxica" que difire de calquera outro tipo de traballo experimental e é o que da un carácter diferencial a esta disciplina. Este modo especial de actuar é o que asenta os conceptos fundamentais de esterilidade e contaminación.

2. A microbiota normal de pel e garganta: observación e cultivo

Grazas á súa gran diversidade metabólica os microorganismos poden colonizar calquera tipo de hábitat: ambientes terrestres, acuáticos, superficies inertes ou vivas. Os microorganismos poden interaccionar con outros seres vivos ben como organismos comensais que non inducen dano ningún ao hospedeiro (microbiota normal), ben como simbioses que se benefician de dita interacción ou como patóxenos causando enfermidades. O obxectivo desta práctica é poñer de manifesto a presenza de microorganismos como parte da microbiota normal do corpo humano.

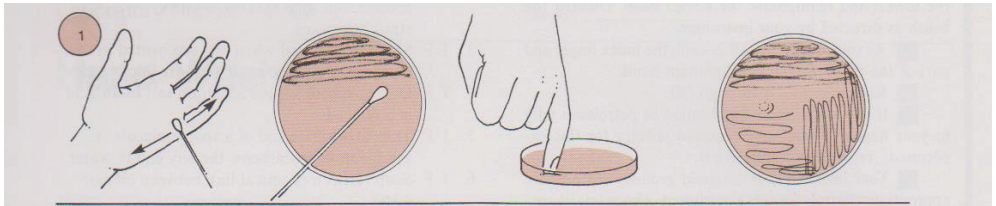
Material:

- Hisopos estériles
- Placas de Agar Sangre e/ou TSA
- Tubos con TSB
- Portaobxectos e cobreobxectos
- Azul de Metileno
- Microscopio

Procedemento:

Coa axuda dun hisopo estéril, tómase mostra de pel na palma da man. Posteriormente, sementase nunha placa de TSA e, coa axuda da asa de sementa, tentárase realizar un illamento en estría.

Nunha marxe da placa, introducírase unha uña no medio, tal e como aparece reflectido no debuxo.



No caso da mostra de garganta, efectuarase a toma coa axuda dun hisopo e sementarase nunha placa de Agar Columbia (AS).



Unha vez tomadas e sementadas as dúas mostras, introducírase cada un dos hisopos nun tubo contendo 1ml de TSB (Tubo 1 e Tubo 2). Os hisopos permanecerán por espazo de 10 min no seu interior, transcorridos os cales refugaranse no colector de residuos da mesa do laboratorio.

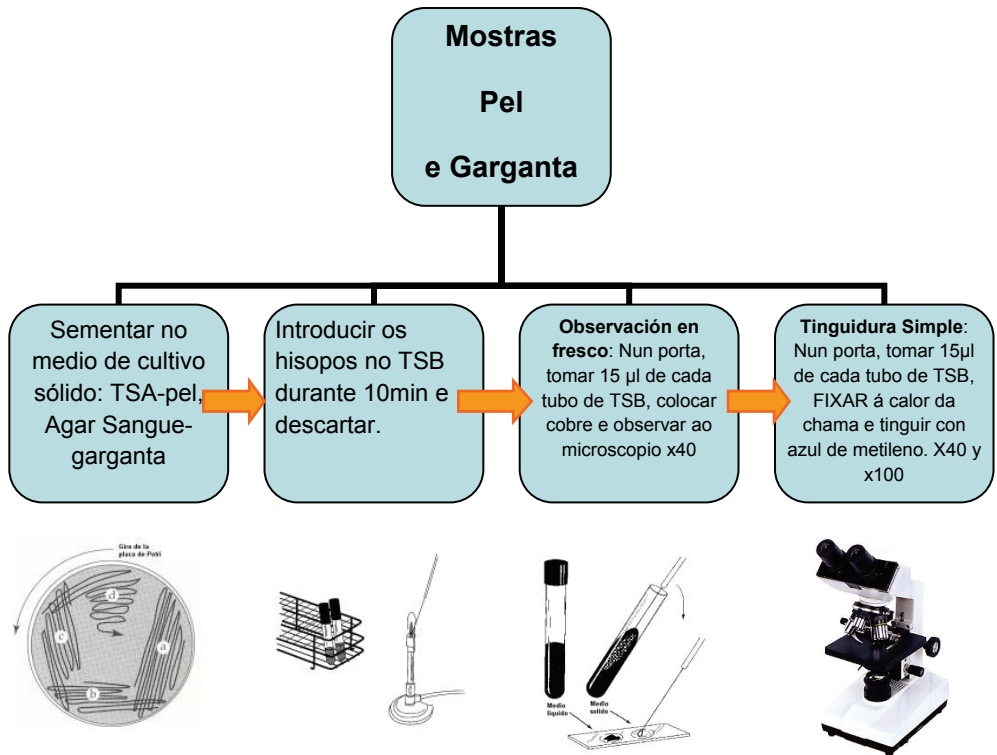
A continuación, 15 μ l de cada tubo transfírense a respectivos portaobxectos, colócase un cobreobxecto e faise a observación en fresco ao microscopio (x40).

Do mesma xeito, 15 μ l de cada tubo transfírense a outros dous portaobxectos, fíxanse as mostras con calor e faise unha tinguidura simple con azul de metileno durante 3 min.

O portaobxectos debe secarse ao aire antes da súa observación ao microscopio (x40 e x100 require aceite de inmersión).

Os tubos manteranse incubados na estufa a 37 °C durante 24 h.

Esquema xeral:



Observacións do alumnado:

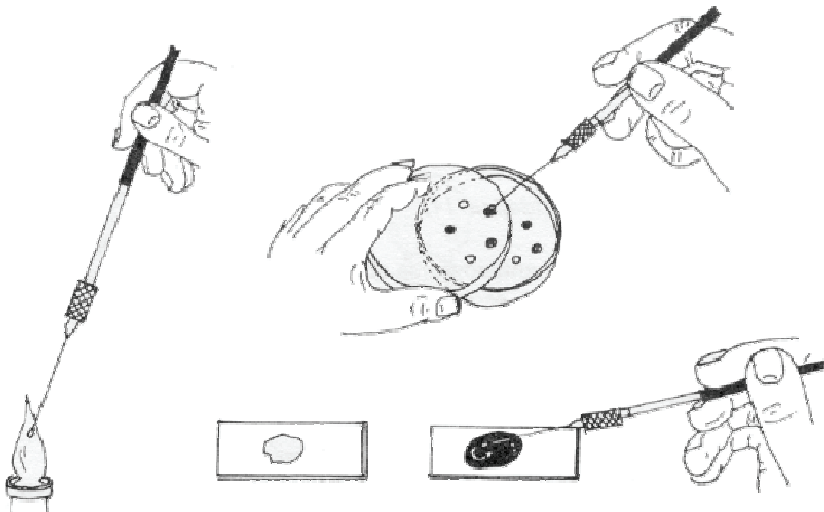
2.1. Tinguidura simple e Tinguidura diferencial de Gram

Ámbalas dúas tinguiduras fanse a partir dos tubos de TSB que conteñen as mostras de pel e de garganta do Día 1 ou ben, a partir das placas.

2.1.1. Extensión e Fixación á calor: Nun portaobxectos ben limpo, coa asa de semente previamente esterilizada á chama, colócase unha pequena cantidade de suspensión de bacterias ou dunha colonia (se a mostra procede dunha placa, débese colocar previamente sobre o porta unha pinga de auga destilada ou solución salina). Co asa esténdese a pinga e as bacterias sobre o porta e fíxase a extensión coa calor, quentando suavemente á chama do chisqueiro ata que seque. A Tinguidura de Gram faise a partir dos tubos de TSB que conteñen as mostras de pel e de garganta do Día 1 ou ben, a partir das placas.

2.1.2. Procedemento da tinguidura simple:

-Azul de metileno 3 minutos



2.1.3. Procedemento da Tinguidura diferencial de Gram:

- Cristal Violeta de Hucker (colorante inicial) 1 minuto
- Lavar con auga destilada
- Lugol (mordente) 1 minuto
- Decolorar con alcohol-acetona (decolorante)
- Lavar con auga destilada
- Fucsina/Safranina básica (colorante de contraste) 1 minuto
- Lavar con auga
- Secar suavemente e sen fregar con papel de filtro

Unha vez a preparación está totalmente seca, poñer unha pinga moi pequena de aceite de cedro e observar ao microscopio co obxectivo de inmersión. **Despois de utilizar o obxectivo de inmersión, debe limpase con xilol.**

O mecanismo da Tinguidura de Gram é o amosado no seguinte esquema:

| Produtos | Reacción e coloración das bacterias | |
|--------------------------|--|---|
| | GRAM + | GRAM - |
| 1) Cristal violeta | Células cor violeta | Células cor violeta |
| 2) Lugol solución iodada | Fórmase o complexo CV-I. As células continúan tinguidas de cor violeta. | Fórmase o complexo CV-I. As células continúan tinguidas de cor violeta. |
| 3) Alcol | Deshidrátanse as paredes celulares. Contráense os poros. Diminúe a permeabilidade. O complexo CV-I non sae das células que continúan tinguidas de cor violeta. | Eliminación por extracción de graxas das paredes celulares. Aumenta a porosidade. O complexo CV-I sepárase da célula. |
| 4) Safranina | Células non decoloradas; quedan tinguidas de cor violeta. | Células decoloradas; tinguidas de cor rosada. |

Observacións do alumnado:

2.2. Illamento e obtención de cultivos puros

Na natureza os microorganismos atópanse en comunidades con diferente grao de complexidade. Por iso, é esencial en Microbioloxía utilizar técnicas que garantan a obtención de cultivos puros ou axénicos (constituídos por un único tipo de microorganismo) a partir dos cales poden realizarse estudos sobre un microorganismo concreto.

O obxectivo desta práctica é conseguir que o alumno sexa capaz de illar unha bacteria utilizando a técnica de esgotamento en estría.

Os medios de cultivo achegan os nutrientes necesarios para a supervivencia dunha gran parte das bacterias.

Os compoñentes máis usuais son:

- Extracto de carne
- Peptonas
- Cloruro sódico
- Tampóns estabilizadores de pH
- Axentes solidificantes
- Axentes redutores
- Axentes selectivos (colorantes, biles, antibióticos...)
- Azucres
- Indicadores de pH

Os medios clasifícanse:

Seguen a composición:

- Definidos: coñécense con exactitude a identidade das sustancias que os integran.
- Indefinidos: conteñen sustancias de natureza complexa cuxa composición é difícil de establecer con precisión (extracto de lévedos, extracto de carne...).

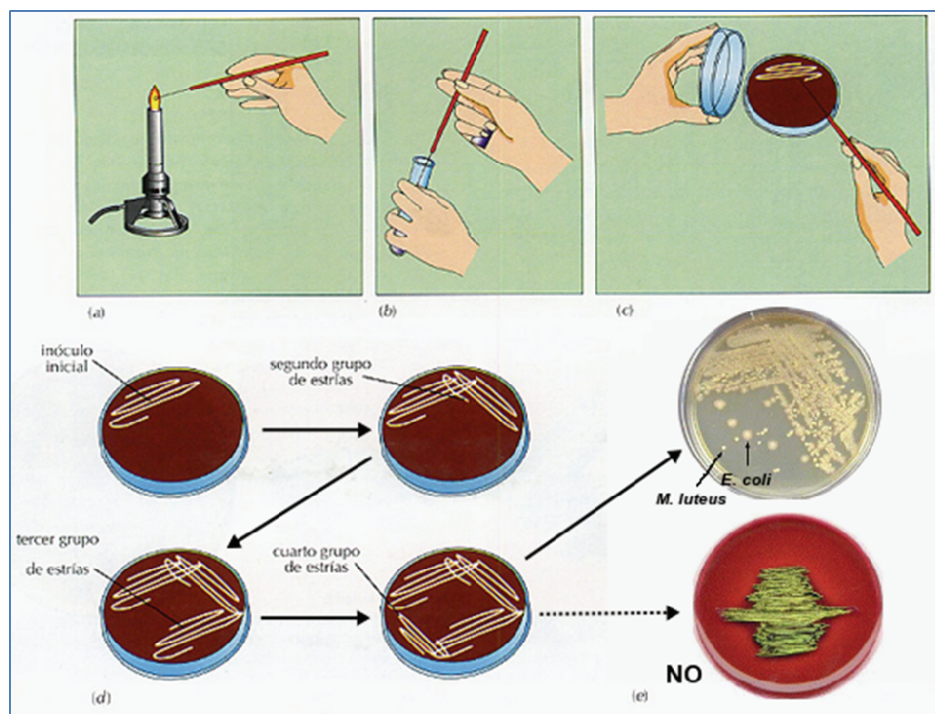
Seguen seu estado físico:

- Sólidos
- Líquidos
- Semisólidos

Seguen á súa aplicación:

- Medios xerais: cobren as necesidades nutritivas da maioría das bacterias.
- Medios enriquecidos: con sangue, soro, vitaminas... para satisfacer as necesidades nutritivas das bacterias máis exixentes.
- Medios selectivos: prepáranse engadindo sustancias específicas a un medio de cultivo que permitan que crezan un grupo de bacterias inhibindo algúns outros grupos. Ex: Agar *Salmonella-Shigella*, Agar Sal-Manitol.
- Medios diferenciais: a incorporación de certos compostos no medio de cultivo pode dar lugar a un crecemento útil para o diagnóstico ou a unha alteración visible do medio despois da incubación. Ex: Agar Levine (eosina e azul de metileno), Agar MacConkey (sales biliares e cristal violeta).
- Medios de caracterización: empélanse para examinar certas características metabólicas das bacterias. Ex: Agar Citrato, Agar Kligler.

O alumno practicará o illamento en diferentes medios de cultivo tal como se indica de seguido.



Observación do alumnado:

3. Mecanismos de patoxenicidade bacteriana

A patoxenicidade é a capacidade dunha bacteria para producir enfermidade infecciosa nun hospedeiro, sendo a virulencia a cuantificación da devandita capacidade. Denomínase infección á multiplicación do patóxeno no interior do hospedeiro. Na maioría das infeccións por bacterias diferéncianse seis fases: colonización, invasión e diseminación, superación dos mecanismos de defensa do hospedeiro, adaptación ás condicións do hospedeiro e lesión.

Os factores de virulencia bacterianos segundo sirvan para colonizar, invadir, evitar a resposta inmune ou producir dano clasifícanse en cinco grupos: adhesinas, invasinas, factores para evadir as defensas do hospedeiro (cápsula, resistencia a lise polo complemento, cambios antixénicos...), sideróforos e toxinas.

O obxectivo desta práctica é dobre:

- a) Analizar a capacidade das bacterias para adherirse á superficie das células.
- b) Comprobar o efecto da libre dispoñibilidade de ferro no crecemento bacteriano.

Adhesinas. Os factores de colonización ou adhesinas son moléculas da superficie bacteriana. Algunhas patóxenas, especialmente Gram(-), empregan como adhesinas as fimbrias (*Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*). Moitas Gram (+) adhírense mediante proteínas da parede (*Streptococcus pyogenes* emprega as proteínas M e F da parede, mentres *Staphylococcus aureus* adhírese a través de proteínas e dos ácidos teicóicos). Tamén as cápsulas e as biopelículas poden ser adhesinas (*Pseudomonas aeruginosa*, adhírese a superficies lisas mediante os polisacáridos mucosos que excreta e crece formando biopelículas e *Streptococcus mutans* excreta glicano para adherirse á superficie do esmalte dos dentes).

Sideróforos. O ferro é un factor nutricional limitante do desenvolvemento das bacterias e, aínda que no noso sangue hai moito ferro, as bacterias patóxenas non poden utilizalo para medrar porque está a formar parte de moléculas de hemoglobina ou de transferrina. As patóxenas capaces de reproducirse no sangue sintetizan sistemas enzimáticos denominados sideróforos, moi eficaces para captar ferro en competencia con estas proteínas do hospedeiro (son exemplos de sideróforos a aerobactina de *Escherichia coli*, a meningobactina de *Neisseria meningitidis*, a enteroquelina de *Salmonella*).

3.1. Estudo da adherencia mediante aglutinación

Material:

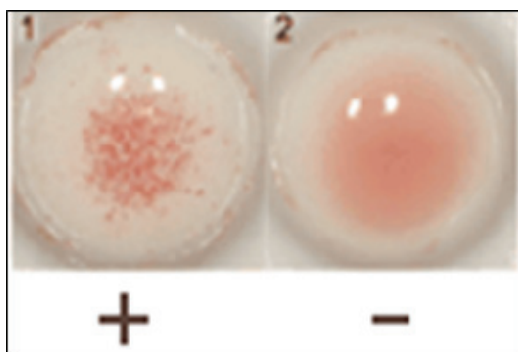
- Cultivos bacterianos en medio sólido
 - *Escherichia coli*
 - *Bacillus sp.*
- Suspensión de glóbulos vermellos formalinizados
- Suspensión de *Saccharomyces cerevisiae* formalinizadas
- Tampón fosfato-salino (PBS)
- Portaobxectos
- Micropipetas (20 – 100µl)
- Tubos
- Microscopio

Con anterioridade:

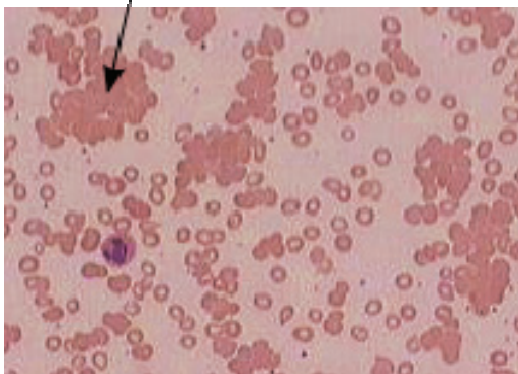
- Sementar na placa a partir dun cultivo puro (illamento ou continuo)
- Incubar a 37 °C durante 24 h

Procedemento:

- a) Recoller unha cantidade abundante do cultivo (3-4 colonias o un asa colmada)
- b) Suspende en 100 µl de PBS
- c) Preparar unha suspensión de glóbulos vermellos ou lévedos ao 1% en PBS
- d) Depositar 40 µl da suspensión de glóbulos vermellos ou lévedos nun portaobxectos
- e) Engadir 40 µl da suspensión de bacterias
- f) Mesturar 'balanceando e rotando' o portaobxectos (durante 2-10 min)
- g) Observar macroscopicamente a existencia ou a non existencia de aglutinación
- h) Observar a aglutinación no microscopio



Positiva



Apéndices:

Formalinización de glóbulos vermellos

1. Suspende as células ao 10% en PBS
2. Preparar formaldehído ao 3% en PBS
3. Mesturar 1 vol de glóbulos vermellos con 1 vol de formaldehído o 3%
4. Axitar moi suavemente durante 18h a tª ambiente
5. Lavar 5 veces en PBS
6. Resuspender ao 10% en PBS
7. Conservar a 4 °C

Formalinización de lévedos (*Saccharomyces cerevisiae*)

1. Suspende os lévedos ao 10% en PBS
2. Preparar formaldehído ao 3% en PBS
3. Mesturar 1 vol de glóbulos vermellos con 1 vol de formaldehído o 3%
4. Axitar moi suavemente durante 18 h a temperatura ambiente
5. Lavar 5 veces en PBS
6. Resuspender ao 10% en PBS
7. Conservar a 4 °C

Tampón fosfato-salino (PBS)

- 137 mM NaCl
 - 2.7 mM KCl
 - 100 mM Na₂HPO₄
 - 2 mM KH₂PO₄
- Axustar o pH a 7.2-7.4 con HCl

Observacións do alumnado:

3.2. Estudo do crecemento en limitación de ferro

Material:

- Cultivos bacterianos en medio sólido
 - *Escherichia coli*
 - *Bacillus sp.*
- Solución 20mM de Desferal (deferroxamine mesylate; MW=657)
- Medio de cultivo líquido (TSB)
- Tubos de tapón de rosca
- Micropipetas (50 µl)
- Espectrofotómetro para tubos

Con anterioridade:

- a) Sementar en placa de TSB (illamento)
- b) Incubar a 37 °C durante 24 h
- c) Preparar os tubos de tapón de rosca con 3ml de medio TSB (2 por alumno)

Procedemento:

1. Engadir 15 µl da solución de Desferal a un dos tubos de TSB
2. Sementar unha colonia do cultivo puro en cada tubo (con/sen Desferal)
3. Incubar a 37 °C durante 24 h
4. Observar a presenza ou ausencia de crecemento
5. Resuspender ben e medir en espectrofotómetro a 492 nm
6. Comparar o crecemento en ámbolos dous medios

Apéndices:

Solución 'stock' de Desferal (válida para todo o curso)

1. Preparar unha disolución 20 mM de Desferal en auga destilada (0,13 g / 10 ml).
2. Esterilizar por filtración (filtros de 0.22 µm)
3. Gardar a 4 °C

Observacións do alumnado:

4. Vías e modos de transmisión de patóxenos: o contacto directo

Denomínase modo de transmisión ao mecanismo polo que un microorganismo patóxeno chega a infectar un novo hospedeiro susceptible. Hai varias vías xerais de transmisión: vía aérea, secrecións de vías respiratorias, auga, alimentos, contacto directo, etc.

A práctica consiste en poñer de relevo a facilidade con que os microorganismos poden transmitirse por contacto tras a manipulación de fómites (neste caso, un produto comestible).

Os aspectos a comentar son a transmisión, as infeccións gastrointestinais, a importancia do lavado de mans na prevención de infeccións gastrointestinais e infeccións nosocomiais.

Material:

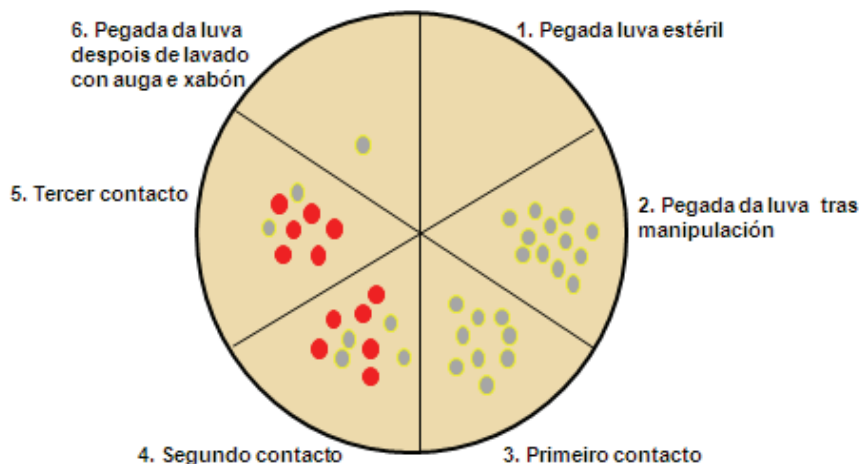
- regaliz
- *Serratia marcescens* CECT 159
- *Micrococcus luteus* CECT 241
- luvas estériles (1 par por grupo)
- 1 placa de TSA (por grupo)
- xabón

Procedemento:

- Repartir luvas estériles a un representante de cada grupo de alumnos. Poñer as luvas á chama, tendo moitísimo coidado de non contaminalos. Facer unha pegada co dedo índice sobre unha placa de TSA dividida en 6 sectores (pegada nº 1). Servirá de control de esterilidade.
- Proporcionar a cada alumno unha lambetada. Previamente á lambetada (no noso caso, regaliz vermello) será esterilizada e contaminada con *Serratia marcescens* (para 1 alumno) e con *Micrococcus luteus* (para 3 alumnos). *Serratia* servirá como exemplo de patóxeno e preténdese que se transmita por contacto entre o alumnado.
- Apalpar a lambetada, sobre todo ao longo da xema dos dedos. Facer unha pegada sobre outro cádrante da placa de TSA (pegada nº 2). Indicaranos que alumno porta o patóxeno.

- Intercambiar un saúdo manual con outro alumno, anotando con quen se saúda. Facer unha nova pegada (nº 3) en TSA. Se hai 4 alumnos, haberá 3 contactos; xa que logo, faranse 3 pegadas (nº 3, nº 4 e nº 5).
- Lavar as mans enluvadas con auga e xabón e SECAR AO AIRE, polo menos, o dedo con que se fan as pegadas e facer unha nova pegada (nº 6).
- Incubar a placa a temperatura ambiente e a luz (para produción de pigmento) durante 48 h.
- Tirar as luvas ao colector para esterilizar.

Representación dun hipotético resultado:



A última pegada reflexa a eficacia, na eliminación das bacterias, dun simple lavado de mans, medida esencial na política de prevención de infeccións nosocomiais e infeccións gastrointestinais.

Observacións do alumnado:

5. Valoración da desinfección de alimentos crus como método preventivo na transmisión de infeccións gastrointestinais

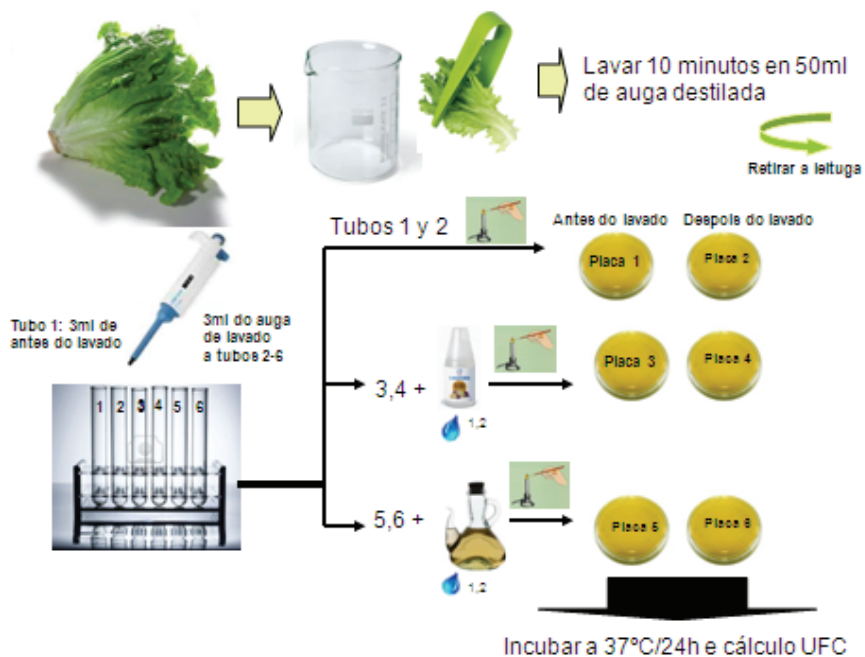
Preténdese poñer de manifesto o poder desinfectante da lixivia e do ácido acético que, adicionados a certos alimentos crus, poden servir para previr a transmisión de infeccións gastrointestinais.

Material:

- Leituga
- Vaso de precipitados
- Solución salina estéril
- Lixivia desinfectante (Amukina...)
- Vinagre caseiro
- Placas de TSA

Procedemento:

1. Córtase unha folla de leituga de, aproximadamente, 10 g e resuspéndese nun vaso de precipitados con 20 ml de auga destilada. Antes de introducila, realízase a toma de 3 ml do auga destilada no Tubo 1.
2. Axitar suavemente e, tras 10 minutos, retirar a leituga.
3. A continuación, repártense 3 ml en 5 tubos estériles, que se marcan como Tubos 2 ao 6, sendo o Tubo 2 o control correspondente a auga de lavado; os tubos 3-6 conteñen auga de lavado que vai ser tratada.
4. Engádese 1 pinga de Amukina ao Tubo 3 e 2 pingas ao Tubo 4; repítase a mesma operación co vinagre nos tubos 5 e 6.
5. Esperar 30 min.
6. De cada tubo retíranse 50 ul e seméntanse nas placas de TSA (Placas 1 a 6).
7. Incubar as placas a 37 °C/24 h e facer recuento do nº total de colonias en cada unha delas.
8. Facer a interpretación dos resultados.



Observações do alumnado:

6. Recollida selectiva de refugallos, esterilización e reciclaxe do material



É unha regra de seguridade fundamental que ningún material infectado pode saír do Laboratorio de Microbioloxía.

Os microorganismos, segundo o seu perigo, clasifícanse en:

- **Grupo de Risco I (baixo risco individual e comunitario)**
 - Microorganismos que de maneira improbable producen enfermidade humana ou animal de importancia.
- **Grupo de Risco II (risco individual moderado, risco comunitario limitado)**
 - Patóxenos que poden causar enfermidade humana ou animal pero que é improbable que sexan un risco grave para o persoal de laboratorio, a comunidade, a gandería ou o medio ambiente.
- **Grupo de Risco III (risco individual alto, comunitario baixo)**
 - Patóxenos que producen enfermidade humana grave que, de ordinario, non se difunden dun individuo afectado a outro.
- **Grupo de Risco IV (elevado risco individual e comunitario)**
 - Patóxenos que producen enfermidade grave humana ou animal e que poden transmitirse con facilidade.
 - O nivel de contención usado para previr a infección accidental ou a contaminación ambiental accidental nos

laboratorios clínicos, de investigación e de docencia debe axustarse para contrarrestar o risco biolóxico potencial dos microorganismos que se manexan no laboratorio.

| Nivel de Seguridade Biolóxica | Laboratorio de Microbioloxía | |
|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| | Exemplo de Laboratorio | Microorganismos |
| Nivel 1 | Docencia | <i>Escherichia, Bacillus ...</i> |
| Nivel 2 | Hospital Universitario | <i>Salmonella, Mycobacterium, ...</i> |
| Nivel 3 | Laboratorio de referencia | <i>C. psitacci, Brucella...</i> |
| Nivel 4 | Máxima seguridade | Virus Ebola, Marburg, Lassa |

Con independencia do nivel de bioseguridade, é importante recordar a necesidade dunha pulcra e esmerada limpeza do material microbiolóxico así como a recuperación do material reciclable e a eliminación do material desbotable. Debe haber no laboratorio catro tipos de recipientes para produtos infectados:

1. Cestos ou bolsas dun só uso para desbotar cultivos e mostras.
2. Recipientes dun só uso para desbotar portaobxectos, pipetas pasteur e pequenos obxectos de vidro.
3. Pipeteiros para pipetas de vidro recuperables.
4. Bolsas de plástico para materiais combustibles, tales como caixas ou envoltorios, que poidan estar contaminados.

Todos os obxectos sucios ou contaminados deben recollese en recipientes adecuados, provistos de tapa. O material de vidro, tubos, matraces e pipetas, sepárase do resto do material recolléndose nun colector vertical ou horizontal cheo dunha solución desinfectante, por exemplo unha solución diluída en lixivia, na que permanecerá antes do seu lavado durante 24 horas.

Como os obxectos contaminados conteñen, con frecuencia, cantidades importantes de materia orgánica (procedente dos medios de cultivo) que protexen aos microorganismos dos axentes físicos ou químicos utilizados na súa contamiación, non pode asegurarse a total destrución das formas vexetativas e moito menos das esporas. Por iso, recoméndase utilizar maiores concentracións de desinfectante e tempos máis longos de tratamento que para a desinfección ou a esterilización de material limpo.

Os métodos de descontaminación de residuos máis empregados son:

6.1. Métodos físicos

6.1.1. Calor húmida en autoclave

Xeralmente utilízase para a descontaminación de instrumentos, equipos e material que sexan estables á calor, así como de material desbotable. Para tal obxecto colócase este material en recipientes adecuados e introdúcense no autoclave someténdoo á acción do vapor de auga a unha atmosfera de sobrepresión (121 °C) en ciclos máis prolongados do habitual (1 hora en lugar de 30 minutos).

6.1.2. Calor seca por aire quente en forno de esterilización

O aire quente é un método efectivo para esterilizar tanto pos secos e substancias aceitosas libres de auga como para calquera tipo de cristalería, como pipetas, frascos e xiringas. Así mesmo, a calor seca non erosiona a superficie de vidro das xiringas non desbotables e non corroe o fio do material punzocortante (bisturís, tesoiras) como o fai o vapor. Os obxectos ou sustancias esterilizados por este procedemento son postos nun forno de esterilización a unha temperatura de ao redor de 170 °C durante 2-3 horas (dependendo do material) para asegurar a esterilización.



Unha vez efectuado este tratamento, procédese ao seu lavado para eliminar toda materia estraña, mergullando o material en auga quente xabronosa ou utilizando deterxentes, mestura crómica ou calquera outro procedemento enérxico, tanto mecánico como químico. Aclárase ben con abundante auga e déixase escorrer e secar a temperatura ambiente. No caso das pipetas, e antes de ser lavadas, debe extraerse con axuda dun arame ou pinzas especiais, o anaco de algodón que teñen na embocadura.

6.2. Desinfección química

Algúns dos obxectos sucios e contaminados (portaobxectos, pipetas, etc.), logo de lavados, mergúllanse nunha mestura sulfocrómica onde se deixan 24 horas ao cabo das cales se lavan con auga e déixanse escorrer. Os portaobxectos sécanse cun pano de fio limpo, procurando que non queden fíos sobre a superficie.

O material que contén colorantes trátase, segundo as condicións do material, durante un tempo variable cunha solución que pode ser de ácido clorhídrico, nítrico ou mestura sulfocrómica.

O resto do material (tubos de plástico, xiringas, etc.) trátase con distintas solucións desinfectantes como hipoclorito sódico, formol, etc., pero debe recordarse que se utilizan a concentracións superiores ás utilizadas con outros fins.

6.3. Incineración



O principal problema con este método é asegurarse de que os residuos chegan realmente ao incinerador e que son completamente incinerados. Sería raro que o incinerador estivese controlado polo persoal de laboratorio; en ocasións, nin sequera o está polo propio persoal do centro (ex. un hospital), senón que se atopa a certa distancia da institución.



Os incineradores non sempre son eficientes. Acháronse entre as cinzas materiais incombustibles e da súa aparición pode dubidarse de se serían suficientemente quentados para matar todos os microorganismos. O tiro de aire pode arrastrar microorganismos á atmosfera se está demasiado cargado ou a carga mal distribuída. Recoméndase que os incineradores para material infeccioso dispoñan de retroquemadores, de maneira que queimen o seu propio fume e convertan súas emanacións en inocuas.

Parece aconsellable utilizar a incineración para materiais que se autolavaron ou se desinfectaron previamente.

CRONOGRAMA DE TRABAJO

Laboratorio de MICROBIOLOXÍA II

| LUNS | MARTES | MÉRCORES | XOVES |
|--|--|--|--|
| O Laboratorio de Microbioloxía Clínica: Normas de seguridade e hixiene. | 2. Tinguadura Gram | Observación do crecemento | 7. Recollida selectiva de residuos, esterilización e reciclaxe do material |
| 1. Obtención de mostras de microbiota normal (pel e garganta) | 3. Illamento e obtención de cultivos puros | 5. Estudo de mecanismos de virulencia bacterianos: adherencia e captación de ferro | Lectura e interpretación de resultados 4. |
| | | | Lectura e interpretación de resultados 5. |
| | | | Lectura e interpretación de resultados 6. |
| <ul style="list-style-type: none"> Observación en fresco Tinguadura simple | 4. Transmisión de patóxeno por contacto | 6. A desinfección na prevención de infeccións gastrointestinais | EXAME |
| Tempo estimado: 4 h | 4 h | 4 h | 2 h |

AVALIACIÓN DA UNIDADE DIDACTICA

Avaliación da Unidade Didáctica

O último día de laboratorio, tras comentar en conxunto os resultados finais, o alumno deberá realizar un exame de 10 preguntas sobre as prácticas desenvolvidas no laboratorio, que terá unha puntuación máxima de 2 puntos.

Avaliación da materia Microbioloxía II

1. O alumnado non será avaliado se non realiza as prácticas de laboratorio.
2. A avaliación consistirá en:
 - a) Realización dun exame teórico sobre os contidos das clases expositivas.
 - b) Valoración da actitude e destrezas demostradas durante as prácticas e o exame práctico.
 - c) Avaliación continua durante as clases interactivas.
 - d) Control regular da asistencia ás clases expositivas.

| | Puntuación |
|--|-------------------|
| Exame de Teoría | 60% |
| Destrezas no laboratorio e exame de prácticas | 20% |
| Asistencia* | 10% |
| Clases Interactivas | 10% |

*Comprobarase a asistencia en dez ocasións ao azar durante as clases expositivas

Para aprobar a materia, o alumnado deberá aprobar o exame e, unha vez sumadas as notas dos outros apartados, alcanzar o 50% da puntuación total. En caso de que o alumno suspenda a materia, a nota correspondente as prácticas de laboratorio manterase ata que a supere.

RECOMENDACIÓNS PARA O ESTUDO DA MATERIA

Aconséllase ao alumnado que, durante as primeiras clases expositivas, se familiarice co vocabulario propio da materia.

Por ser unha materia de poucos créditos, a información que se dá nas clases expositivas está moi condensada, polo que se recomenda a asistencia continuada e o estudo semanal para un maior aproveitamento da materia. Tamén se aconsella a consulta frecuente dalgún dos libros recomendados na bibliografía.

En canto ás clases prácticas, é esencial que o alumno presente unha actitude responsable durante as horas que pasará no laboratorio, do que se desprenderá a adquisición de destreza na manipulación dos microorganismos.

Respecto das clases interactivas, o alumno beneficiarase dunha actitude participativa, sendo o momento máis adecuado para a súa intervención na aula.

BIBLIOGRAFIA BÁSICA E COMPLEMENTARIA

Básica

G. PRATS (2006) *Microbiología Clínica*. Editorial Panamericana, S.A.

W.J. SPICER (2009) *Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas*. Elsevier España, S.L.

Complementaria

M. COMIS, J. PRIETO e J. BARBERAN (1995) *La infección en imágenes*. Vol. I e II. Grupo Bristol-Myers Squibb.

L.M. PRESCOTT, J.P. HARLEY e D.A. KLEIN (2002) *Microbiología*. 5ªEd. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.

M.T. MADIGAN, J.M. MARTINKO, P.V. DUNLAP e J.P. Brock (2004). *Biología de los Microorganismos*. 12ªEd. Pearson Educación, S.A.

C. GAMAZO, I. LOPEZ-GOÑI e R. DIAZ (2005) *Manual Práctico de Microbiología*. 3ª Ed. Masson.

J.K. STRUTHERS e R.P. WESTRAN (2005) *Bacteriología Clínica*. Masson S.A.

R.A. HARVEY, P.C. CHAMPE e B.D. FISHER (2007) *Microbiología*. 2ª Ed. Wolters Kluwer / Lippincott, Williams & Wilkins.

G.J. TORTORA, B.R. FUNKE e C.L. CASE (2007) *Introducción a la Microbiología*. 9ªEd. Editorial Médica Panamericana.

http://ocw.usal.es/eduCommons/ciencias-biosanitarias/laboratorio-clinico-de-microbiologia/contenidos/pdfs/BIOQUIMICA_TEMA2.pdf



Unha colección orientada a editar materiais docentes de calidade e pensada para apoiar o traballo do profesorado e do alumnado de todas as materias e titulacións da universidade



Impreso en papel 100% reciclado e libre de cloro



SERVIZO DE NORMALIZACIÓN
LINGÜÍSTICA



9 788498 879056

ISBN 978-84-9887-905-6